

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-124980

(43)Date of publication of application : 21.05.1993

(51)Int.Cl.

A61K 37/50
A23L 1/30
A23L 2/00
A23L 2/26
A61K 7/00
A61K 7/48
//(A61K 37/50
A61K 31:355)
(A61K 37/50
A61K 31:375)
(A61K 37/50
A61K 37:14)

(21)Application number : 03-311662

(71)Applicant : SNOW BRAND MILK PROD CO LTD

(22)Date of filing : 30.10.1991

(72)Inventor : NIIMOTO YOJI

DOSEMARI SHUNICHI

(54) AGING PREVENTING AGENT

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain an aging preventing agent consisting of a peroxidase and capable of prolonging human life and preventing aging by suppressing in vivo production of peroxilipids causing aging.

CONSTITUTION: The objective aging preventing agent is obtained by blending a peroxidase (preferably lactoperoxidase using cow milk as a feed source), as an active ingredient, preferably at a ratio of 0.1–5wt%. This agent is preferably combinedly used with vitamin E as an antioxidant and/or lactoferrin. Furthermore, iron ion concentration in the aging agent is kept preferably ≤50ppm in order to prevent the activity of the lacto peroxidase from the disturbance.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 27.10.1997

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3103167

[Date of registration] 25.08.2000

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(45)発行日 平成12年10月23日 (2000. 10. 23)

(24)登録日 平成12年8月25日 (2000. 8. 25)

(51)Int. Cl.

識別記号

A61K 38/44
A23L 1/30
2/00
2/52
A61K 7/00

F I

A61K 37/50
A23L 1/30
A61K 7/00

Z
H
K
W

請求項の数8 (全6頁) 最終頁に続く

(21)出願番号

特願平3-311662

(73)特許権者 000006699

雪印乳業株式会社

北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号

(22)出願日

平成3年10月30日 (1991. 10. 30)

(72)発明者

新本 洋士

(65)公開番号

特開平5-124980

埼玉県川越市旭町2丁目13-2-416

(43)公開日

平成5年5月21日 (1993. 5. 21)

(72)発明者

堂迫 俊一

審査請求日

平成9年10月27日 (1997. 10. 27)

埼玉県浦和市北浦和5-15-39-616

(74)代理人

100090941

弁理士 藤野 清也

審査官 田村 聖子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】老化防止剤

1

【(57)【特許請求の範囲】】

【請求項1】 パーオキシダーゼを有効成分とすることを特徴とする、生体内で過酸化脂質の生成を抑制する老化防止剤。

【請求項2】 パーオキシダーゼがラクトパーオキシダーゼである請求項1記載の老化防止剤。

【請求項3】 パーオキシダーゼと抗酸化剤及び／またはラクトフェリンとを有効成分とすることを特徴とする、生体内で過酸化脂質の生成を抑制する老化防止剤。

【請求項4】 抗酸化剤がビタミンEまたはアスコルビン酸である請求項3記載の老化防止剤。

【請求項5】 請求項1～4のいずれかにおいて、パーオキシダーゼ含量が0.1～5重量%である老化防止剤。

【請求項6】 老化防止剤中の鉄イオン濃度が50ppm以下である請求項1～4のいずれかに記載の老化防止剤。

2

【請求項7】 経口組成物の形態をしている請求項1～6のいずれかに記載の老化防止剤。

【請求項8】 外用剤の形態をしている請求項1～6のいずれかに記載の老化防止剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、パーオキシダーゼ、特にラクトパーオキシダーゼを有効成分とする、生体内で過酸化脂質の生成を抑制する老化防止剤に関する。

【0002】

【従来の技術】 現在先進諸国においては寿命が延び、また出生率が低下していることから、社会の高齢化が急速に進んでいる。高齢化が進むことによって直面することになる最も大きな問題は老化である。

【0003】 老化は加齢に伴って生じる様々な現象、す

なわち、視力低下、記憶障害、運動能力低下、免疫機能低下、聴力障害等の総称である。

【0004】老化の原因としては様々な要因が提示されているが、老化速度を決定する要因として注目されているのが活性酸素やハイドロキシラジカルのような過酸化状態にある物質によるDNAの損傷である。したがって、このような過酸化物質の除去、あるいは生成を防止するような物質は、老化を防止する機能を有する。

【0005】これらの物質としてはスーパーオキサイドディスムターゼ等の酵素あるいは抗酸化物質等がある。スーパーオキサイドディスムターゼやカタラーゼはそれぞれスーパーオキサイドラジカル、過酸化水素を生体内から除去するのに役立っている。また、抗酸化物質は、過酸化物質による老化を防ぐ働きがある。

【0006】活性酸素、酸素ラジカル、ハイドロキシラジカルのような物質の寿命は短い。しかし、生体内では、これらの酸化状態は過酸化脂質中に蓄えられている。過酸化脂質は不飽和脂肪酸分子内にペーオキサイド結合を持っており、老化に伴う続発性疾患の原因となることが指摘されている。

【0007】ハイドロキシラジカルや過酸化脂質の生成には遷移金属が重要な役割を果たしている。すなわち、鉄イオンは、マロンジアルデヒドの生成を促進することがJanesら[Brain. Res., 246, 113-119(1982)]によって報告されているし、最近では、Kobayashiら[Agric. Biol. Chem., 54, 69-76 (1990)]によって、鉄(II)、銅(II)イオン存在下で過酸化水素がDNAに損傷を与えることが示されている。したがって、このような遷移金属が生体内に過剰に存在することは、老化の原因となる。

【0008】これまでに提案されている老化防止物質には発毛再伸剤(特開昭55-164616号公報)、ペプチド含有化粧料による皮膚老化防止剤(特開昭56-115707号公報)、植物抽出成分や骨髄成分を含有する食品(特開昭61-15423号公報、特開昭61-82744号公報)などがある。また、過酸化脂質生成防止を目的とした老化防止物質としては大豆サポニン(特開昭56-73025号公報)、アゼピノカルボリン誘導体(特開昭55-65619号公報)が提案されている。

【0009】しかし、これらの物質はいずれも遷移金属由来の過酸化脂質の生成を抑制しうるものではない。一方、Gutteridgeら[Biochem. J., 199, 259(1981)]は乳中の鉄結合性タンパク質であるラクトフェリンが、鉄依存性の過酸化脂質生成を抑制することを見出した。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、このように過酸化脂質の生成が老化を生ずる原因になるという見地から、生体内において鉄を主とする遷移金属の存在に基づく過酸化脂質の生成を阻止し、老化を防ぐ物質の探索を行なった。すなわち、本発明の課題は、新規で有

効な、生体内で過酸化脂質の生成を抑制する老化防止剤を提供することにある。

【0011】本発明は、このような生体内における鉄を主とする遷移金属の存在に基づく過酸化脂質の生成に着目し、この生成をペーオキシダーゼ、特にラクトペーオキシダーゼが抑制することができるかどうか検討を行つた。

【0012】本発明者らは、まず種々の物質を食品に添加して過酸化脂質生成抑制効果を検討したところ、ペーオキシダーゼ、特にラクトペーオキシダーゼを0.1~5重量%配合した組成物が生体内で過酸化脂質の生成を抑制することができることを見出し、本発明を完成するに到つた。

【0013】特に、本発明者らは、ラクトフェリンを用いた鉄依存性過酸化脂質生成抑制試験を追試した際に、乳中の酵素、ラクトペーオキシダーゼについても過酸化脂質生成抑制作用があるかどうか検討した。その結果ラクトペーオキシダーゼにラクトフェリンとほぼ同等の過酸化脂質生成抑制効果があることを見出した。

【0014】ラクトペーオキシダーゼの作用は過酸化水素の分解によるハイドロキシラジカル生成の防止である。生体内での過酸化水素の分解においては、カタラーゼやグルタチオンペーオキシダーゼが働くとされている(大澤俊彦、月刊フードケミカル、1991年1月号P59~65)。しかし、ラクトペーオキシダーゼの抗酸化作用についてはこれまで詳しい研究は行なわれていなかった。本発明はこのようなラクトペーオキシダーゼが生体内において鉄依存性過酸化脂質生成抑制作用をもつことを見出したものである。

【0015】

【課題を解決するための手段】本発明は、ペーオキシダーゼを有効成分とする、生体内での過酸化脂質の生成を抑制する老化防止剤に関する。さらに、本発明は、ペーオキシダーゼと抗酸化剤とを有効成分とする、生体内での過酸化脂質の生成を抑制する老化防止剤に関する。

【0016】ペーオキシダーゼには、ミエロペーオキシダーゼ、ホースラディッシュペーオキシダーゼ、アルスママイセスペーオキシダーゼ等が用いられるが、過酸化脂質生成防止効果及び安全性の点から、ラクトペーオキシダーゼの使用が望ましい。ラクトペーオキシダーゼは哺乳動物の乳から調製することが可能である。給源としては、ウシ、水牛、ヒト、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウマ等の乳があげられるが、牛乳を用いることが量及び質の面から望ましい。

【0017】ラクトペーオキシダーゼは、公知の物質であって、それを製造するには、公知の方法、例えばスルホン化担体を用いてラクトペーオキシダーゼを吸着し、精製する方法(特開平3-109400号公報)が工業的有利に利用することができる。

【0018】ラクトペーオキシダーゼは、鉄イオンが存

在すると、鉄とラクトパーオキシダーゼとが総合してその作用が弱まるので、鉄イオン濃度は出来る限り低いことが望ましい。50ppm以上となるとラクトパーオキシダーゼによる過酸化脂質生成抑制能が著しく低下する。

【0019】ラクトパーオキシダーゼは種々の形態の組成物に老化防止作用を有する成分として添加することが可能である。例えば、製剤上慣用の担体、賦形剤等と混合し、成型を行なって錠剤、顆粒剤、カプセル剤あるいはドリンク剤等として医薬あるいは健康食品として用いることができる。また、食品成分と混合し食品として用いることもできるし、飼料成分あるいは餌料成分と混合して飼料、餌料として用いることができる。さらに、このような経口的な使用ばかりではなく、クリームの成分と混合して医薬用軟膏あるいは化粧クリーム等のような外用剤として用いることもできる。本発明の老化防止剤は、一般的な製剤ばかりではなく、このような医薬品、飲食品、飼料、餌料等の経口組成物、クリーム、軟膏等の外用剤等をも老化防止剤という。

【0020】そして、パーオキシダーゼの使用量は、症状、性別、体重等によって異なるが成人男子1日当たり約0.5～5gを1回乃至数回に分けて経口投与することが好ましい。

【0021】老化防止剤の製造にあたってはラクトパーオキシダーゼの酵素活性を失なわせないような殺菌処理が必要である。殺菌は温湯な状態での加熱が望ましいが、特願平3-257010号で開示された方法、すなわち0.1モル以上の1価塩溶液中で殺菌する方法を用いると、パーオキシダーゼの酵素活性の低下を防止して付着する微生物を効率的に殺滅することができる。

【0022】また、抗酸化剤、特に脂溶性酸化防止剤、例えばビタミンEおよび/または、鉄イオンをキレートするラクトフェリンなどをラクトパーオキシダーゼと共に配合することはさらに望ましい。抗酸化剤としては、エリソルビン酸、エリソルビン酸ナトリウム、dl- α -トコフェロール(ビタミンE)等があるが、これらを用いることができる。しかし、特にビタミンEが天然に存在し毒性のない酸化防止効果を奏すことから特に有用

である。その使用量は組成物中0.001～1%が望ましい。

【0023】ラクトパーオキシダーゼは生体内に発生した過酸化水素の除去に有効だと考えられるのに対し、ラクトフェリンは、ラジカル生成を触媒する鉄イオンを除去するのに有効である。したがってラクトパーオキシダーゼとラクトフェリンの両者を混在させることによって老化防止剤の作用機作が広がり、その結果様々な過酸化脂質生成要因に対して広範に効果を発揮することができる。ラクトフェリンの使用量も0.1～5重量%であることが望ましい。

【0024】また、ラクトパーオキシダーゼ及びラクトフェリンに加えて、ビタミンEとを併用することによって相乗的に生体内での過酸化脂質の生成を抑制することができる。本発明では、好ましくは、ラクトパーオキシダーゼの作用発現を妨害しないように鉄含量の少ない、他の食品素材と組み合わせるのがよい。

【0025】本発明者らは以下の試験例によって、ラクトパーオキシダーゼの添加量を決定した。

【0026】〔試験例1〕

ラクトパーオキシダーゼによる鉄依存性過酸化脂質生成の抑制

シグマ社のリポソームキット(卵黄レシチン由来)に5mlの20mMペペス(N-[2-ヒドロキシエチル]ピペラジンN'-(2-エタンスルホン酸))を含む生理食塩水(pH8.2)を加え、超音波処理してリポソームを調製した。リポソーム200μl, 80μMのFeNH₄(SO₄)₂溶液100μl, 300μMのアスコルビン酸100μl, ラクトパーオキシダーゼ溶液100μlをフタ付き試験管に入れ、さらに生理食塩水で全量を1mlに調整した。混合液を37°Cで1時間インキュベーション後生じた過酸化脂質をTBA法[Buege, J.A. and Aust. S.T.D. Methods Enzymol., 52, 302-310(1978)]で測定した。過酸化脂質濃度はマロンジアルデヒド(MDA)相当量として表示した。

【0027】結果を表1に示す。

【表1】

ラクトパーオキシダーゼ濃度 (終濃度、mg/ml)	過酸化脂質生成量 (nmol)	抑制率 (%)
1.0	0.22	100.0
0.5	0.28	90.6
0.1	0.70	25.0
0.01	0.80	9.4
0	0.86	0.
鉄-アスコルビン酸不含のコントロール	0.22	(-)

【0028】この表にみられるように、0.1mg/mlのラクトパーオキシダーゼは鉄-アスコルビン酸による過酸化

脂質生成を25%抑制した。1mg/mlのラクトパーオキシダーゼは完全に抑制した。

【0029】〔試験例2〕

ラクトパーオキシダーゼ給餌ラットにおける血中過酸化脂質生成抑制

表2に示す組成の飼料を4週齢SD系雄ラット(日本クレア)5頭づつに与え、6週間飼育後、エーテル麻酔下

で心臓採血を行ない、血液中過酸化脂質濃度をTBA法で測定した。結果を表3に示す。表3にみられるように、試験食中に1%以上ラクトパーオキシダーゼを添加した群では著しい血中過酸化脂質濃度の低下がみられた。

【0030】

【表2】

	標準食	試験食
カゼイン	25%	25%
トウモロコシ油	5	5
塩類混合物*	4	4
ビタミン混合物**	1	1
塩化コリン	0.2	0.2
ウシラクトパーオキシダーゼ	—	0.5, 1, 2, 4
しょ糖	しょ糖で全量を 100%とした	しょ糖で全量を 100%とした

* ミネラル混合物MM-2 [Ebihara et al. J. Nutr. 109, 2106 (1979)]

** ハーパーの混合物 [Harper, J. Nutr., 68, 405 (1959)]

【0031】

【表3】

ラクトパーオキシダーゼ量 (%)	血中過酸化脂質濃度(5頭の平均値) (nmol/ml)
0	1.86
0.5	1.68
1	1.24
2	1.30
4	1.32

【0032】なお、試験食中の鉄含量は38ppmであった。試験例1及び2より、ラクトパーオキシダーゼ添加量は0.1~5%が適当であると判断した。

【0033】次に、本発明の実施例を示し、本発明をさらに具体的に説明する。

【0034】

【実施例1】

ラクトパーオキシダーゼ含有老化防止剤

(1) 粉末食品

脱脂粉乳 960g にウシラクトパーオキシダーゼ粉末20

g、ガラクトシルラクトース35%を含むオリゴ糖粉末20gを混合し、粉末食品を調製した。鉄含量は5ppmであった。

【0035】(2) 飲料

表4に示した配合比で混和した原料ミックスに水を加えて全量を100lとし、これをジャケット式タンクで65°C、30分間加熱殺菌後、プラスチック無菌プローボトルに160mlずつ充填した。鉄含量は1ppmであった。

【0036】

【表4】

ショ糖	11kg
香料	100g
冷凍濃縮果汁(B×45)	12l
ウシラクトパーオキシダーゼ	600g
d1- α -トコフェロール (1%、アルコール溶液)	50ml

【0037】(3) ヨーグルト

水22.1gに脱脂粉乳 3.6gを溶解し、95°Cで30分間加熱殺菌保持後、37°Cに冷却し、市販のL. bulgaricusおよびS. thermophilus(いずれもハンセン社)の混合スターターを0.3g接種し、37°Cで6時間培養した。この培養物に対し、ラクトパーオキシダーゼおよびラクトフェリンをそれぞれ2gづつ添加し、攪拌、冷却し、ヨーグルト調製用乳酸菌スターターを得た。

【0038】次に乳脂肪 3.5%に標準化した生乳(市販

牛乳)970gにビタミンE 0.05gを添加し、90°Cで10分間加熱殺菌保持後、37°Cに冷却し、先に調製した乳酸菌スターターを30g接種し、カップに充填後37°Cで乳酸酸度0.85%まで培養後直ちに冷却し、プレーンヨーグルトを調製した。ヨーグルトの鉄含量は1.2ppmであった。

【0039】(4) 化粧クリーム

以下の表5に示される組成を混合乳化させてクリームを調製した。

【表5】

多価アルコール脂肪酸エステル	10g
流動パラフィン	10g
1, 3-ブチレングリコール	5g
ステアリン酸	5g
グリセリン脂肪酸エステル	5g
ポリエチレングリコール脂肪酸エステル	2g
ベヘニルアルコール	1g
メチルパラベン	0.1g
ブチルパラベン	0.1g
ラクトフェリン	100mg
ラクトパーオキシダーゼ	100mg
脱イオン水	全量を 100g に調整

【0040】

【実施例2】

製品投与試験①

実施例1-(2)で調製した飲料を、一群5頭のSD系ラット(4週齢オス)に自由摂取させた。飼料は市販の飼料

(日本クレアCE-2)を与えた。6週間後の血中過酸化脂質濃度を試験例2にしたがって測定した。その結果を表6に示す。

【0041】

【表6】

飲 料	血中過酸化脂質濃度 (nmol/ml)
水	1.76
試験飲料	1.30

【0042】実施例1-(2)の飲料は、血中過酸化脂質を低下させる効果があることが確認された。

【0043】

【実施例3】

製品投与試験②

実施例1-(1)で製造した粉末食品を表7に示すように飼 40

料に配合し、一群10頭のBALB/C系マウス(5週齢オス)に与え、水、飼料を自由摂取させ、長期飼育して、寿命を測定した。

【0044】

【表7】

	標準食 (重量部)	試験食 (重量部)
脱脂粉乳	30	—
オリゴ糖粉末	0.6	—
実施例1-(1)の粉末	—	30
トウモロコシ油	3	3
塩類混合物(MM-2)	4	4
ハーバーのビタミン混合物	1	1

11

12

塩化コリン	0.2
しょ糖	しょ糖で全量を 100とした。

0.2
しょ糖で全量を
100とした。

【0045】この試験結果を表8に示す。試験食投与群では寿命が著しく延長され、寿命延長効果があることが

確認された。

【表8】

平均寿命	
標準食	596日
試験食	625日

【0046】

【発明の効果】本発明の老化防止剤は、老化の原因となる過酸化脂質の生体内での生成を抑制し、寿命を延長さ

せ、老化防止する効果を奏するので高度の機能性組成物として有用である。

フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

F I

A 6 1 K 7/00

A 6 1 K 7/48

7/48

A 6 1 P 39/06

A 6 1 P 39/06

A 2 3 L 2/00

Z

2/26

(56)参考文献

特開 昭63-226243 (J P, A)

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)

特開 平4-210591 (J P, A)

A61K 38/00 - 38/58

特開 平1-157914 (J P, A)

C A (S T N)

特開 昭61-200915 (J P, A)

M E D L I N E (S T N)

K o b a y a s h i e t a l ,
The effects of met
al ions on the DNA
damage induced by
hydrogen peroxide
, Agricultural and
Biological Chemistry,
1990年、第54巻、第1号、pp
69-76

中村良、「食品機能化学」、三共出版
株式会社、1990年、pp 65-69

G u t t e r i d g e , e t a l ,
' Inhibition of lip
id peroxidation by
the iron-binding
protein lactoferrin ', Biochemical Journal,
1981年、第199巻、pp 259-
261

**THIS PAGE BLANK AS PER
SPPU**